

## 論文の要約

氏名：渡 邊 雅 弘

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Peripheral glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the functional recovery of mechanical nociception following inferior alveolar nerve transection in rats

(末梢のグリア細胞由来神経栄養因子はラットの下歯槽神経切除による機械的侵害受容の機能的回復を促進する)

下顎神経の枝である下歯槽神経 (IAN) は抜歯、歯科インプラント埋入、下顎骨の骨折や歯内治療などの外科的処置によって損傷されることがある。IAN が損傷を受けるとしばしば口腔顔面領域に感覚機能障害が引き起こされるが、歯科臨床ではビタミン製剤やレーザーなどによる姑息的な治療のみが行われているのが現実である。このような治療は奏功しないことが多く、IAN 損傷による感覚機能障害に対する新たな治療法の開発が望まれている。これまでの研究により、末梢神経の損傷後、損傷神経の末梢端において神経成長因子である Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) が合成され、形態学的に損傷神経の軸索再生および髄鞘形成が促進されることが知られている。しかし、機能的軸索再生、すなわち感覚機能の回復における末梢神経損傷部位での GDNF シグナル伝達の役割に関しては不明な点が多く、新たな原因療法を開発するには、その詳細なメカニズムの解明が急務である。そこで、本研究では IAN 損傷後の損傷部位における GDNF の内在性供給源を同定し、GDNF シグナル伝達が顔面痛覚の回復を促進するか否かを明らかにすることを目的とした。

実験には 6~7 週齢、雄性の Sprague Dawley ラットを用いた。ブトルファノール酒石酸塩、メドトミジンおよびミタゾラムを混合した麻酔薬で深く麻酔し、左頬部皮膚と咬筋に切開を加え、低速のラウンドバーを用いて下顎骨表面を切削して IAN を露出させた。実体顕微鏡下でオトガイ孔から遠位 5 mm の部分で左 IAN 切除 (IANX) を行い、損傷 IAN を下顎管に戻した後、皮膚・筋肉切開部位を 5-0 絹糸で縫合した。

IANX あるいは Sham 処置後の侵害受容感覚の変化を確認するために、イソフルラン吸入によって後肢屈曲反射が観察できる一定の麻酔深度に保ち、左顔面皮膚に対する機械的刺激によって誘発される頭部引込め反射閾値 (MHWT) を測定した。IANX 後 5 日目に、ELISA キットを用いて IANX 部位の GDNF 量を測定するとともに、損傷 IAN を含む下顎骨を摘出、脱灰後、切片標本作製し、免疫組織学的解析を行った。つぎに、生理活性物質の持続放出を行うゼラチンベースのハイドロゲルである MedGel とフィブリンゲルに 20  $\mu$ l の GDNF を混和して IANX 部位へ填入した IANX+GDNF 群と、同基剤に 20  $\mu$ l の 0.01M phosphorylated buffered saline (PBS) を混和して填入した IANX+PBS 群を作製した。IANX 後 5 日目に、ラットをペントバルビタールナトリウムにて深く麻酔し、生理食塩水で経心的灌流後、4% パラホルムアルデヒドにて固定した。さらに、損傷 IAN の組織学的回復を検証するため、生理食塩水に溶解した 2.5  $\mu$ l FluoroGold (FG) を 2% イソフルランによる浅麻酔下で、30 ゲージの注射針を用いて顔面皮膚に注入した。FG 投与 3 日後 (IANX 後 8 日目) に 0.1M PBS で希釈した 4% パラホルムアルデヒド固定液で経心的灌流を行い、三叉神経節 (TG) を取出して切片標本作製した。FG で標識された TG 細胞の細胞面積と細胞数を計測し、ヒストグラムを作成した。GDNF 局所投与が侵害受容感覚機能回復に及ぼす影響を確認するため、IANX+GDNF 群及び IANX+PBS 群へ GDNF family receptor alpha 1 (GFR $\alpha$ -1) 中和抗体 (GFR $\alpha$ 1 Nab) を IANX 直後から 13 日目まで毎日 IANX 部位へ投与した IANX+GDNF+GFR $\alpha$ 1 Nab 群における MHWT の測定を行った。また、IANX 後 8 日目に、GFR $\alpha$ -1 を発現する Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), TRP vanilloid 1 (TRPV1) または Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel (Nav1.8) 陽性 TG 細胞数を免疫組織化学的に解析した。

上記の実験から以下の結果が得られた。1) IANX により MHWT は Sham 群に比較して 1 日目から 11 日目まで有意に高い値を示したが、この MHWT の有意な上昇は 13 日目に消失した。2) IANX 後

5 日目に IANX 部位への炎症性細胞浸潤を検索した結果, IANX+PBS 群では GDNF を発現するリンパ球, 好中球およびマクロファージの浸潤が観察されたが, Sham 群では認められなかった。3) IANX+PBS 群における IANX 部位の GDNF 量は, Sham 群と比較し有意な増加を認めた。4) IANX 後 5 日目, IANX 部位への GDNF 投与により, FG 標識にされた小型 (細胞径:  $\leq 199 \mu\text{m}^2$ ,  $200\text{--}399 \mu\text{m}^2$ ) TG 細胞の有意な増加を認めた。5) GDNF レセプターである GFR $\alpha$ -1 が TG 細胞にて発現していることを免疫組織化学的に確認した。6) GDNF 投与により MHWT の有意な回復が促進され, さらに GDNF 投与による MHWT の回復促進は切除部位への GFR $\alpha$ 1 Nab 投与により有意に抑制された。7) IANX 後 8 日目, GFR $\alpha$ 1 陽性の TRPA1 および Nav1.8 陽性細胞数は有意に減少し, TRPV1 陽性細胞数の有意な増加を認めた。このことから GDNF が侵害刺激を受容するイオンチャネルの発現調節に関与していることが示された。

以上の実験結果は, IANX 部位に浸潤したマクロファージおよび好中球から放出された GDNF が損傷感覚神経終末に発現する GFR $\alpha$ 1 と結合することにより, 侵害受容性の無髄および細い有髄神経の再生が促進されることを示している。すなわち IANX 部位の GDNF シグナル伝達の亢進が軸索形成を加速して侵害受容性神経の再生を促すことにより, IAN 損傷後の機械的侵害受容の機能的回復をもたらしている可能性がある。さらに本研究結果では, GDNF 付加 MedGel を用いた IANX 部位への GDNF の持続的投与は, IANX 後の顔面皮膚の機械的侵害受容の機能的回復に有効であることを確認した。したがって, 生理活性物質の持続放出が可能なゼラチンベースのハイドロゲルである MedGel による GDNF 投与は, IANX 後の顔面皮膚における正常な痛覚受容機能回復を促進するための治療の選択肢となる可能性が示された。